

• 药理与临床 •

基于中药传统用法的毒性 Q-Marker 发现：以吴茱萸为例

王亮^{1,2}, 窦立雯², 郭威^{1,2}, 李晓宇¹, 杨倩^{2,3}, 吴晓文¹, 孙蓉^{1*}

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

3. 日照市中医医院, 山东 日照 276800

摘要: **目的** 基于中药传统用法的科学解析, 以吴茱萸为例, 建立中药毒性质量标志物(Q-Marker)的辨识技术。**方法** 以吴茱萸水煎时“久煎”和“汤洗”的传统用法的文献研究为切入点, 运用指纹图谱和质谱技术对吴茱萸水煎液的成分进行表征, 以正常人肝细胞(L02)的生长抑制率、乳酸脱氢酶(LDH)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)等指标对吴茱萸水煎液的体外肝毒性进行评价, 采用灰色关联分析法进行“谱-毒”相关分析。**结果** 吴茱萸水煎液的肝毒性随着煎煮时间的延长, 存在先升高后降低的变化趋势, 通过“谱-毒”关联分析发现, 大极性成分可能是吴茱萸水煎液中的肝毒性 Q-Marker, 通过液质联用解析为咖啡酰葡萄糖酸异构体, 揭示了吴茱萸“久煎”和“汤洗”的科学内涵, 建立了基于吴茱萸传统用法的肝毒性 Q-Marker 辨识技术。**结论** 中药传统用法的科学解析作为中药毒性 Q-Marker 辨识的切入点具有可行性。

关键词: 中药传统用法; 毒性 Q-Marker; 吴茱萸; 指纹图谱; 谱毒相关

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)06-1159-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.017

Toxic Q-Marker identification based on conventional application of traditional Chinese medicine: Taking *Euodiae Fructus* as an example

WANG Liang^{1,2}, DOU Li-wen², GUO Wei^{1,2}, LI Xiao-yu¹, YANG Qian^{2,3}, WU Xiao-wen¹, SUN Rong¹

1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. Rizhao City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rizhao 276800, China

Abstract: Objective To establish a method for the toxic Q-Marker identification of traditional Chinese medicine (TCM), based on the scientific analysis on the conventional application of TCM and taking *Euodiae Fructus* as a case study. **Methods** Taking the literature research of the conventional application of “Jiu Jian” and “Tang Xi” as the breakthrough point, the components of *Euodiae Fructus* decoction were characterized by fingerprint and mass spectrometry technology, and the hepatotoxicity of *Euodiae Fructus* decoction was evaluated by the growth inhibition rate, lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) of normal human liver cells (L02). The “spectrum-toxicity” relationship analysis was performed by grey relational analysis. **Results** The hepatotoxicity of *Euodiae Fructus* decoction first increased and then decreased with the prolongation of boiling time. Through the “spectrum-toxicity” relationship analysis, it was found that the polar components could be the hepatotoxic Q-Marker in *Euodiae Fructus* decoction, and the polar components were characterized as isomers of caffeoyl gluconic acid. The scientific connotation of “Jiu Jian” and “Tang Xi” was revealed and the hepatotoxic Q-Marker identification method of *Euodiae Fructus* was established. **Conclusion** It is feasible to take the scientific analysis of conventional application as the breakthrough point for the toxic Q-Marker identification of TCM.

Key words: conventional applications of traditional Chinese medicine; toxic Q-Marker; *Euodiae Fructus*; fingerprint; spectrum-toxicity relationship

收稿日期: 2017-01-25

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”)中医基础理论专项资助项目课题 2 (2009CB522802); 国家重大新药创制重大专项课题: 中药复方药理学研究与药效评价关键技术 (2009ZX09502-015); 山东省自主创新和成果转化课题: 药物安全性评价和适宜于抗肿瘤及缺血性脑血管疾病多靶点和复方新药成药性评价关键技术研究 (2014ZZCX02104); 山东省中医药科技发展计划课题: 吴茱萸肝毒性氧化损伤路径与凋亡机制研究 (2013-120); 泰山学者工程专项经费资助 (Ns201511107)

作者简介: 王亮(1981—), 男, 山东淄博人, 助理研究员, 在读博士, 研究方向为中药分析与质量控制。Tel: 18615201331 E-mail: wliang81@gmail.com

*通信作者 孙蓉, 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药理与毒理研究。Tel: (0531)82949843 E-mail: sunrong107@163.com

中药的毒性有狭义和广义之分,《内经》认为“药即为毒”,中药之毒即其效,提出了毒的广义概念;而近现代的毒一般指其毒副作用和毒性反应,是毒的狭义概念^[1]。在临床实践中,因为与药物的安全性和有效性直接相关,中药的毒性一直备受关注,加上近年来中药中毒事件时有发生^[2-4],严重影响了中医的声誉和中医药事业的发展,因此,有必要对有毒中药的毒性物质基础、作用机制、安全限度和质量控制等进行深入研究,建立健全有毒中药的合理评价体系。结合刘昌孝院士提出的中药质量标志物(Q-Marker)的新概念^[5-6],本课题组提出了基于“谱-毒”相关的毒性 Q-Marker 合理辨识与科学控制的研究思路^[1],并以吴茱萸为例进行了初步研究。

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实,归肝、脾、胃、肾经,具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效^[7]。吴茱萸始载于《神农本草经》,列为中品,为温中止痛的必备药,其味辛、苦,性热,有小毒。近年来,随着吴茱萸临床应用的拓展,服用生吴茱萸、炮制不透的吴茱萸和过量服用导致中毒的报道越来越多,引起了业界的广泛关注^[8]。近年来,国内外学者对吴茱萸的毒性进行了较为深入的研究,发现吴茱萸水提物、醇提物、挥发油、生物碱等不同部位或成分群均具有一定的毒性,其毒性表现以肝损伤为主,并具有一定的“量-时-毒”关系^[9-13],其肝毒性机制可能与氧化应激和炎症反应有关^[14-15]。

吴茱萸临床应用主要有水煎煮、全粉入药、外敷 3 种用法,如吴茱萸汤为水煎煮,左金丸为全粉入药。在对吴茱萸方剂的文献研究中发现,吴茱萸在汤剂使用时,多数中医文献提到吴茱萸临用前需要“汤洗”且“煎煮”时间较长,如东汉张仲景所著《伤寒论》记载:“吴茱萸汤。方二十九。吴茱萸,一升,洗。……,右四味,以水七升,煮取二升”,后世也多沿用了“久煎”和“汤洗”的用法。吴茱萸自《神农本草经》后出现了炮制的记载,其目的均为去小毒、去苦味、去涎等^[16],由于吴茱萸自古以来均被认为有“毒”,故推测吴茱萸“久煎”“汤洗”的传统用法与其毒性相关。因此,本研究以吴茱萸“久煎”“汤洗”的传统用法文献研究为切入点,运用指纹图谱、质谱分析和体外肝毒性评

价技术,采用灰色关联分析法进行“谱-毒”相关分析,初步锁定肝毒物质基础,建立中药毒性 Q-Marker 合理辨识技术,并以吴茱萸为例,解析中药传统用法的科学内涵。

1 材料

1.1 试剂与药材

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110753-200413),噻唑蓝(MTT, Sigma 公司,批号 20160512);丙氨酸转氨酶(ALT)测试盒(批号 20161016,货号 C009-2)、天冬氨酸转氨酶(AST)测试盒(批号 20161004,货号 C010-2)、乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(批号 20160928,货号 A020-2),均为微板法,购于南京建成生物工程研究所;乙腈(色谱纯,德国 Fisher 公司),水为超纯水,甲酸、甲醇等其他试剂均为分析纯。吴茱萸样品共 12 份,经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实,见表 1。

表 1 吴茱萸样品信息

Table 1 Specific information of samples

编号	批号	来源	基原
S1	150301	浙江	石虎
S2	1206170422	江西	石虎
S3	150801	浙江	石虎
S4	141001	浙江	石虎
S5	141201	浙江	石虎
S6	150909	江西	疏毛吴茱萸
S7	1208011952	江西	疏毛吴茱萸
S8	150504004	江西	疏毛吴茱萸
S9	20150625	湖南	疏毛吴茱萸
S10	150701	江西	吴茱萸
S11	121105	贵州	吴茱萸
S12	140815	浙江	吴茱萸

1.2 仪器

1200 系列高效液相色谱系统, ChemStation 工作站, 二极管阵列检测器, 自动进样器(美国安捷伦公司); 6320 离子阱质谱检测器(美国安捷伦公司); BP211D 型电子天平(德国赛多利斯集团); LC-350A 超声波中药处理机(济宁市中区鲁超仪器厂); KDM 型控温电热套(鄞城华鲁电热仪器有限公司); BB-16 型二氧化碳培养箱(德国贺利氏集

团); XSZ-D 倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); Multiskan Go 型酶标仪 (芬兰雷勃公司); 超低温冰箱 (中国海尔集团); 96 孔培养板 (美国康宁公司); 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); Simplicity 纯水仪 (美国密理博公司)。

1.3 细胞系

人正常肝细胞 L02 细胞系, 购自中国科学院上海细胞生物研究所, 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 进行常规培养, 实验均在细胞生长对数期进行。

2 方法与结果

2.1 吴茱萸 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品适量,

精密称定, 加甲醇配制成 1 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 取吴茱萸供试品粉末 (过 3 号筛) 0.5 g, 精密称定, 加入 25 mL 水, 称质量, 回流提取 60 min, 冷却至室温, 用水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.3 色谱条件 色谱柱 Thermo Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.3% 磷酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~25 min, 4%~6.5% B; 25~32 min, 6.5% B; 32~37 min, 6.5%~8% B; 37~56 min, 8% B; 56~75 min, 8%~17% B; 75~90 min, 17%~20% B; 90~120 min, 20%~50% B; 120~135 min, 50% B; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 220 nm。色谱图见图 1。

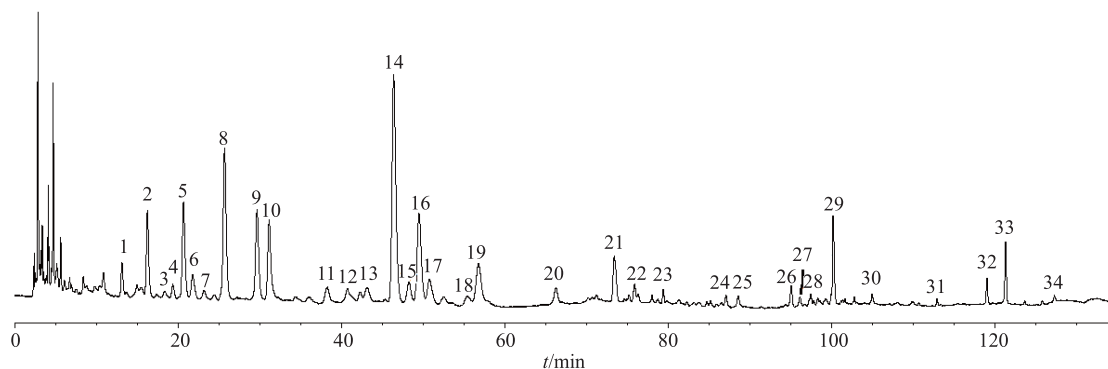


图 1 吴茱萸总提物的 HPLC-UV 图

Fig. 1 HPLC-UV chromatogram of total extract from *Euodiae Fructus*

2.1.4 方法学考察 取同 1 份 (编号 S1) 吴茱萸样品, 进行精密度试验、重复性试验、稳定性试验, 以图 1 中色谱峰 14 为参照峰, 各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3%, 表明仪器精密度和方法重复性良好, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.5 相似度评价 将按照“2.1.3”项中方法所得 12 批吴茱萸指纹图谱数据依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件。以 S1 号样品色谱图作为参照图谱, 经过多点校正、自动匹配, 以中位数法生成对照图谱, 标定了 34 个指纹峰, 指纹图谱叠加图见图 2, 计算相似度, 各样品指纹图谱相似度为 0.869~0.997, 结果见表 2。

2.1.6 指纹图谱数据分析 将获得的指纹图谱 12×34 数据矩阵导入 SIMCA-P 14.1 进行偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) [17]。首先提取主成分, 前 3 个主成分累积贡献率 R^2_Y (cum) 达到 92.5%, 可以解释原变量 92.5% 的信息, 超过了主成分分

析一般要求的 85%, 表示模型概括解释率的参数 R^2_X (cum) = 0.689, 表明模型预测能力的参数 Q^2 (cum) = 0.724, 一般认为 R^2 和 Q^2 值大于 0.5 时, 模型的稳定性及预测能力均较好, 可以进行分析, 以前 3 个主成分绘制 3D 散点图, 见图 3, 进行层序聚类分析 (HCA), 树状图见图 4。从图 3 和图 4 可以看到样品分为 3 类, 样品 S1~S5、S6~

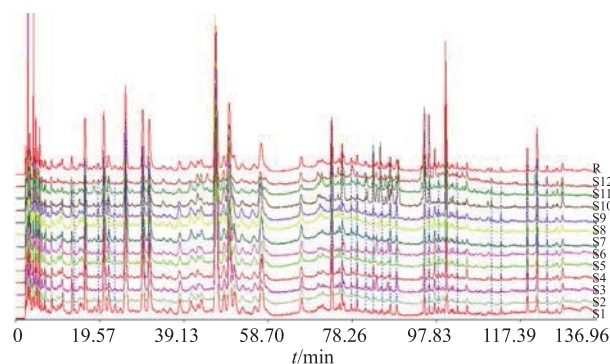
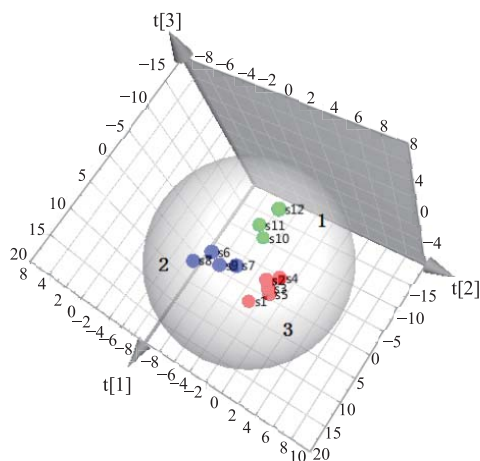


图 2 12 批吴茱萸样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 12 batches of *Euodiae Fructus*

表 2 指纹图谱相似度结果
Table 2 Similarity results of HPLC fingerprints

样品	相似度												对照
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
S1	1.000	0.992	0.984	0.983	0.991	0.979	0.992	0.993	0.990	0.881	0.903	0.948	0.993
S2	0.992	1.000	0.984	0.975	0.979	0.975	0.995	0.991	0.991	0.869	0.899	0.962	0.990
S3	0.984	0.984	1.000	0.971	0.977	0.990	0.983	0.978	0.982	0.913	0.898	0.964	0.986
S4	0.983	0.975	0.971	1.000	0.993	0.976	0.987	0.985	0.979	0.917	0.945	0.932	0.993
S5	0.991	0.979	0.977	0.993	1.000	0.972	0.988	0.986	0.977	0.897	0.920	0.930	0.992
S6	0.979	0.975	0.990	0.976	0.972	1.000	0.983	0.983	0.988	0.921	0.912	0.969	0.989
S7	0.992	0.995	0.983	0.987	0.988	0.983	1.000	0.997	0.994	0.890	0.918	0.962	0.997
S8	0.993	0.991	0.978	0.985	0.986	0.983	0.997	1.000	0.996	0.888	0.919	0.960	0.996
S9	0.990	0.991	0.982	0.979	0.977	0.988	0.994	0.996	1.000	0.890	0.916	0.971	0.993
S10	0.881	0.869	0.913	0.917	0.897	0.921	0.890	0.888	0.890	1.000	0.953	0.879	0.909
S11	0.903	0.899	0.898	0.945	0.920	0.912	0.918	0.919	0.916	0.953	1.000	0.882	0.930
S12	0.948	0.962	0.964	0.932	0.930	0.969	0.962	0.960	0.971	0.879	0.882	1.000	0.961
对照	0.993	0.990	0.986	0.993	0.992	0.989	0.997	0.996	0.993	0.909	0.930	0.961	1.000



1-吴茱萸 2-疏毛吴茱萸 3-石虎, 图 4 同

1-*Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 2-*Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 3-*Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang, same as figure 4

图 3 PLS-DA 得分 3D 散点图

Fig. 3 Scatter 3D plot of *Euodiae Fructus* samples through PLS-DA

S9、S10~S12 分别聚为 1 类, 分别对应石虎、疏毛吴茱萸和吴茱萸, 分类与基原符合, 说明建立的指纹图谱可以反映不同吴茱萸样品的化学成分区别。

2.2 不同煎煮时间的吴茱萸水煎液对 L02 细胞的影响

2.2.1 供试品溶液制备 取 S1 吴茱萸供试品粉末(过 3 号筛) 0.5 g, 精密称定, 加入 25 mL 水, 称质量, 回流提取, 提取时间为 10~120 min, 间隔 10 min, 冷却至室温, 用水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

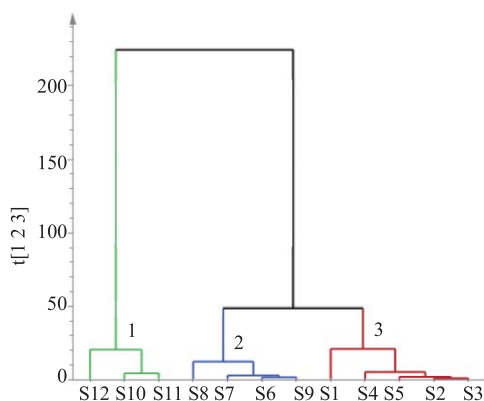


图 4 样品聚类分析树状图

Fig. 4 Clustering dendrogram of *Euodiae Fructus* samples

2.2.2 细胞生长曲线的测定 将 L02 细胞以 1.2×10^4 /mL 接种在 48 孔细胞板上于 37 °C、5% CO₂ 培养, 24 h 后除对照组其余各孔均加入不同煎煮时间的吴茱萸样品培养 24 h, 每隔 4 h 用酶标仪测定培养液 490 nm 处吸光度(A)值。每组设置 3 个复孔, 连续观察 48 h, 绘制细胞生长曲线。

不同煎煮时间的吴茱萸样品作用后 L02 细胞的生长曲线见图 5, 结果表明在接种 L02 细胞 16 h 之后细胞呈现对数增长, 在 24 h 时达到峰值, 一般选择在 L02 细胞的对数生长期进行药物干预, 因此 24 h 为最佳给药时间。

在给予不同煎煮时间的吴茱萸样品干预后, 相较于对照组, 药物组细胞整体呈现生长抑制状态; 药物各组间对比显示, 随着煎煮时间的延长, 药物

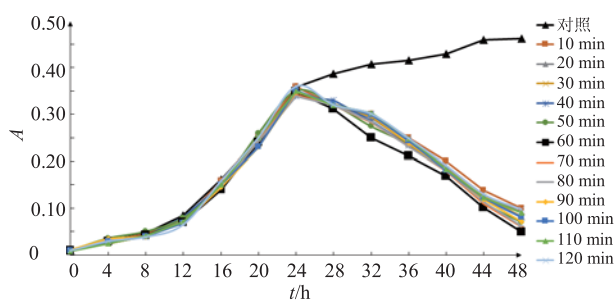


图 5 不同煎煮时间吴茱萸样品对 L02 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of *Euodiae Fructus* samples on growth of L02 cells in different decoction time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

对细胞的抑制作用增强, 在 60 min 时吴茱萸药物组对细胞的抑制作用最强, 随后延长煎煮时间, 抑制作用相较于 60 min 组减轻。提示在 60 min 前吴茱萸随煎煮时间的延长毒性作用增加, 呈现时间-毒性作用正相关, 在 60 min 之后随煎煮时间的延长毒性作用出现不同程度的减弱, 但此时不具有时间-毒性作用负相关性, 说明延长煎煮时间具有降低吴茱萸毒性的作用。

2.2.3 不同煎煮时间的吴茱萸样品对 L02 细胞抑制的影响 将培养 48 h 后的 L02 细胞取出, 吸弃培养基, 每孔加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 200 μ L, 置培养箱中继续培养 4 h 后, 吸去培养基, 每孔加入 DMSO 100 μ L, 震荡混匀, 用酶标仪检测 570 nm

波长下的 A 值。计算增殖抑制率 (IR, $IR = 1 - \text{药物组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$)。不同煎煮时间的吴茱萸样品对 L02 细胞的 IR 变化曲线见图 6。

结果表明在给予不同煎煮时间的吴茱萸样品后, L02 细胞呈现不同程度的增殖抑制, 煎煮时间 60 min 前, 水煎液对 L02 细胞的 IR 随煎煮时间的延长而增加, 在 60 min 时达到峰值, 60 min 后 IR 迅速下降并保持减弱趋势, 提示延长煎煮时间具有降低吴茱萸对人正常肝细胞增殖抑制的作用。

2.2.4 不同煎煮时间的吴茱萸样品对 L02 细胞上清液 LDH、ALT、AST 的影响 取上述培养的细胞上清液 10 μ L, 根据 LDH、ALT、AST 试剂盒说明书进行操作, 检测不同煎煮时间的吴茱萸样品对 L02 细胞上清液 LDH、ALT 和 AST 的影响, 结果见表 3。

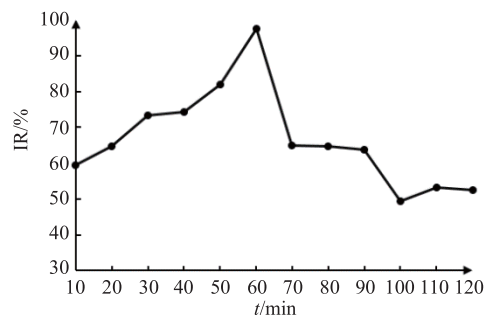


图 6 不同煎煮时间吴茱萸样品对 L02 细胞的 IR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 IR of *Euodiae Fructus* samples to L02 cells in different decoction time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 不同煎煮时间的吴茱萸样品对 L02 细胞上清液中 LDH、ALT、AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of *Euodiae Fructus* samples on activities of LDH, ALT, and AST in supernatant of L02 cells in different decoction time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	LDH/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	8.27 ± 5.61	19.60 ± 9.80	13.39 ± 6.41
吴茱萸 煎煮 10 min	41.33 ± 13.51*	42.12 ± 8.89**	39.37 ± 13.30***
煎煮 20 min	42.07 ± 12.74*	43.33 ± 10.17**	41.23 ± 10.84***
煎煮 30 min	50.31 ± 15.62**	48.67 ± 9.62**	43.99 ± 12.19***
煎煮 40 min	52.64 ± 20.10**	50.54 ± 13.28***	47.62 ± 16.41***
煎煮 50 min	58.79 ± 21.17***	60.07 ± 16.18***	55.23 ± 12.82***
煎煮 60 min	61.26 ± 21.01***	61.44 ± 15.72**	58.72 ± 15.89**
煎煮 70 min	28.33 ± 16.41*	30.65 ± 11.37**	30.69 ± 15.68***
煎煮 80 min	30.15 ± 17.77*	33.58 ± 10.23**	31.45 ± 15.11***
煎煮 90 min	32.66 ± 18.30*	35.22 ± 10.96**	34.21 ± 12.54***
煎煮 100 min	30.71 ± 14.26*	31.77 ± 7.65**	30.28 ± 13.01***
煎煮 110 min	26.22 ± 13.80*	30.86 ± 9.14**	31.33 ± 10.87***
煎煮 120 min	27.35 ± 15.11*	28.93 ± 8.33*	28.90 ± 11.02***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

从表 3 可见, 吴茱萸煎煮时间为 60 min 时, 对 L02 细胞的影响达到最大, 与对照组相比较, LDH、ALT 和 AST 均有显著差异 ($P < 0.001$)。煎煮时间在 10~60 min 时, 随煎煮时间的延长, L02 细胞上清液 LDH、ALT 和 AST 的变化增强; 吴茱萸煎煮时间为 60 min 时, 对 L02 细胞的影响达到最大, 与对照组相比较, 此时 LDH、ALT 和 AST 的增长幅度最高, 分别为 61.26%、61.44% 和 58.72%。在 60 min 之后程度减轻, 到 120 min 时, 与 60 min 比较, 各指标分别下降 55.35%、52.91% 和 50.78%。以上数据说明吴茱萸煎煮一段时间后肝毒性会达到峰

值, 延长煎煮时间可不同程度地降低吴茱萸对 L02 细胞的毒性作用。

2.3 谱毒相关分析

采用 Matlab (R2012a) 软件, 利用灰色关联分析法进行谱毒相关分析。以指纹图谱共有峰面积为子序列, 不同煎煮时间的吴茱萸样品对 L02 细胞上清液 LDH、ALT、AST 的指标值为母序列, 对数据进行无量纲化处理, 分别计算灰色关联度, 根据关联度大小确定各色谱峰对各指标的贡献度大小, 灰色关联分析结果见表 4。

从表 4 中数据可见, 对于 L02 细胞的 LDH、

表 4 吴茱萸谱毒灰色关联分析结果

Table 4 Results of grey relational analysis

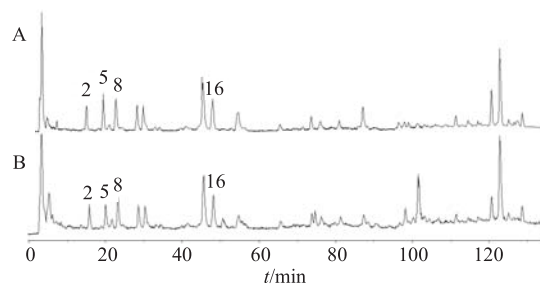
峰号	LDH 关联度	峰号	AST 关联度	峰号	ALT 关联度
5	0.730 66	5	0.764 82	8	0.754 65
2	0.722 61	2	0.755 12	5	0.751 64
8	0.712 00	8	0.749 81	2	0.751 07
7	0.710 94	7	0.724 26	15	0.729 98
15	0.690 12	15	0.718 93	25	0.729 28
16	0.680 63	25	0.710 45	16	0.728 36
25	0.678 08	16	0.710 04	28	0.722 89
28	0.664 68	28	0.697 59	7	0.712 45
9	0.652 36	11	0.680 26	11	0.699 37
30	0.651 72	30	0.679 70	9	0.696 15

AST、ALT 毒性指标, 成分 2、5、8 均高度相关, 关联度均 > 0.7 , 呈现了很高的一致性, 提示成分 2、5、8 可能是吴茱萸水煎液的毒性成分。在指纹图谱中, 2、5、8 号峰在乙腈为 4%~6.5% 即可洗脱, 保留时间短, 说明三者均为大极性成分, 因此, 吴茱萸水煎液中的大极性成分可能为肝损伤成分, 从现代研究的角度证明了吴茱萸“汤洗”的传统用法可降低吴茱萸的肝毒性。

2.4 质谱分析

2.4.1 质谱条件 采用“2.1.3”中的色谱条件, 将流动相磷酸水溶液换为同浓度的甲酸水溶液进行质谱检测。采用电喷雾离子源; 正负离子交替扫描模式; 扫描级数 5 级; 扫描范围 m/z 50~1 000; 扫描速度 m/z 26 000/s; 喷雾气压力 241.325 kPa (35 psi); 干燥气温度 350 °C; 干燥气流速 9 L/min; 毛细管电压 4 000 V, 分流比 4 : 1。总离子流图见图 7。

2.4.2 质谱解析 质谱 TIC 图进行高斯平滑处理, 对 2、5、8 色谱峰积分, 分别抽取色谱峰平均质谱



A-负离子模式 B-正离子模式 16-绿原酸
A-negative ions model B-positive ions model 16-chlorogenic acid

图 7 吴茱萸样品质谱 TIC 图

Fig. 7 Total ion chromatogram of *Euodiae Fructus* samples

图, 扣除背景噪音, 记录 MS^n 各级质谱 TIC 图主要离子碎片平均丰度, 同时记录各峰全扫描紫外光谱的吸收峰, 结果见表 5。

通过与绿原酸紫外光谱对比发现, 峰 2、5、8 的紫外吸收光谱与绿原酸完全一致, 说明 2、5、8 分子中的生色团和母核结构应与绿原酸基本相同, 均为桂皮酰共轭体系^[18]。

表 5 吴茱萸成分质谱数据
Table 5 MS analysis of contents in *Euodiae Fructus*

峰号	正离子模式 (<i>m/z</i>)	负离子模式 (<i>m/z</i>)	相对分子质量	分子式	λ /nm	推断化合物
2	MS ¹ : 341.1 (100%), 359.1 (51.3%)	MS ¹ : 455.0 (100%), 357.0 (33.0%)	358	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	λ_{\max} 218, 240, 298, 326 λ_{\min} 264	咖啡酰葡萄糖酸
	MS ² : 163.0 (100%), 323.1 (14.4%)	MS ² : 357.0 (100%), 194.9 (10.9%)				
	MS ³ : 145.1 (100%), 135.1 (29.4%), 117.2 (20.3%)	MS ³ : 194.9 (100%), 129.0 (5.6%), 339.0 (5.2%)				
	MS ⁴ : 117.1 (100%), 89.3 (10.0%)	MS ⁴ : 129.0 (100%), 176.9 (19.2%), 158.9 (12.8%), 99.2 (7.1%)				
5	MS ¹ : 341.1 (100%), 359.1 (40.9%)	MS ¹ : 455.0 (100%), 357.0 (38.2%)	358	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	λ_{\max} 218, 240, 298, 326 λ_{\min} 264	咖啡酰葡萄糖酸
	MS ² : 163.0 (100%), 323.1 (12.1%)	MS ² : 357.0 (100%), 194.9 (29.8%)				
	MS ³ : 145.1 (100%), 135.1 (37.3%), 117.2 (14.6%)	MS ³ : 194.9 (100%), 129.0 (6.2%), 339.0 (3.9%)				
	MS ⁴ : 117.1 (100%), 89.3 (9.3%)	MS ⁴ : 129.0 (100%), 176.9 (22.1%), 158.9 (15.2%), 99.2 (6.9%)				
8	MS ¹ : 341.1 (100%), 359.1 (57.3%)	MS ¹ : 455.0 (100%), 357.0 (74.4%)	358	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	λ_{\max} 218, 240, 298, 326 λ_{\min} 264	咖啡酰葡萄糖酸
	MS ² : 163.0 (100%), 323.1 (14.8%)	MS ² : 357.0 (100%), 195.0 (10.8%)				
	MS ³ : 145.1 (100%), 135.1 (32.4%), 117.2 (15.5%)	MS ³ : 194.9 (100%), 129.0 (9.6%), 339.0 (8.1%)				
	MS ⁴ : 117.1 (100%), 89.3 (7.9%)	MS ⁴ : 129.0 (100%), 176.9 (18.5%), 158.9 (12.7%), 99.1 (5.7%)				
16	MS ¹ : 355.1 (100%)	MS ¹ : 451.0 (100%), 353.0 (55.1%)	354	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	λ_{\max} 218, 240, 298, 326 λ_{\min} 264	绿原酸 (对照品)
	MS ² : 163.0 (100%), 145.1 (6.1%)	MS ² : 353.0 (100%), 190.9 (7.4%)				
	MS ³ : 145.1 (100%), 135.1 (29.3%), 117.2 (26.0%)	MS ³ : 190.9 (100%)				
	MS ⁴ : 117.1 (100%), 89.3 (6.1%)	MS ⁴ : 127.0 (100%), 85.3 (82.9%), 93.2 (58.8%), 172.9 (53.5%), 111.1 (35.7%)				

对峰 2、5、8 的正离子模式多级质谱进行解析发现, 其正离子模式的裂解方式基本一致, 且各级质谱的离子碎片丰度差异不大, 应为结构相似的同分异构体。一级质谱均包含 $[M+H]^+$ 和 $[M-H_2O+H]^+$, $[M-H_2O+H]^+$ 均为基峰; 二级质谱中质荷比 *m/z* 163 的离子碎片与绿原酸二级质谱中 *m/z* 163 的离子碎片裂解方式和碎片离子峰丰度基本一致, 绿原酸二级质谱中的 *m/z* 163 离子碎片为绿原酸中酯键发生异裂, 咖啡酸一侧碳氧键断裂, 丢失 1 分子奎宁酸后生成的 $[咖啡酸-H_2O+H]^+$ 特征碎片, 因此推断峰 2、5、8 的结构中包含 1 分子咖啡酸。

对峰 2、5、8 的负离子模式多级质谱进行解析发现, 一级质谱中基峰均为溶剂加合离子, 二级质谱基峰为准分子离子峰 $[M-H]^-$, 三级质谱为母离子发生异裂, 咖啡酸一侧的碳氧键断裂, 丢失 1 分子咖啡酸后的特征碎片, 质荷比为 *m/z* 195。参考绿原酸的裂解方式, 绿原酸丢失 1 分子咖啡酸后产生奎宁酸的特征碎片 $[奎宁酸-H]^-$, 质荷比为 191, 推断峰 2、5、8 的分子结构与咖啡酸缩合的部分比奎宁酸相对分子质量大 4, 应为结构与奎宁酸类似, 相对分子质量为 196 的有机酸, 分子式经计算为 C₆H₁₂O₇, 推断为葡萄糖酸。

最终推断峰 2、5、8 均为咖啡酸与葡萄糖酸缩合产生的咖啡酰缩酚酸, 由于葡萄糖酸结构中存在 4 个手性碳, 因此, 2、5、8 应为手性不同导致的同分异构体。具体的缩合位点和分子结构还需进一步研究。

3 讨论

本实验供试品制备采用水回流提取, 预试验采用单因素法考察了煎煮时间和液固比, 分别 60 min 和 50 : 1 时提取效果较好。色谱柱考察了 Thermo Synchronis C₁₈、Sciencome Kromasil C₁₈、Agilent Zorbax SB-C₁₈、Agilent Eclipse XDB-C₁₈, 流动相考察了磷酸水、甲酸水和乙酸水, 结果发现色谱柱采用 Thermo Synchronis C₁₈, 流动相采用乙腈-磷酸水体系分离度较好。对色谱图采集波长进行了考察, 进行全波长扫描发现 210 nm 时色谱信息最丰富, 但是因为接近流动相的截止波长, 基线难以平衡且噪音大、稳定性差, 检测波长大于 240 nm 时会发生较多色谱信息丢失, 故选择色谱信息较丰富、稳定性和信噪比较高的 220 nm 作为检测波长。

前期研究证实, 吴茱萸有肝脏毒性^[13,19-20], L02 细胞为人肝细胞, 适宜于肝毒性的发现和评价, 且与临床体内毒副作用相关性高, 故选择 L02 细胞作

为毒性评价模型。通过不同时间点吴茱萸水煎液的肝毒性研究发现,煎煮时间为 60 min 时,水煎液的肝毒性达到最大值,其后迅速降低,在之后的 60 min 内保持较平缓的降低趋势,这个结果证明吴茱萸“久煎”可以降低肝毒性,为历代文献记载的吴茱萸汤需“久煎”提供了现代毒理学证据。

自《伤寒论》记载吴茱萸汤“汤洗”之后,后世含吴茱萸的方剂其用法中细分为“汤洗”“汤淘”“汤浸”“汤泡”等,关于时间的记载有“七次”“三遍”“一宿”等,并没有详细的温度记载^[21]。但初步提示“汤洗”的用法旨在减少大极性成分,此为古人最朴素的减毒方法;本研究采用灰色关联分析方法对吴茱萸水煎液化学成分的表征和体外肝毒性结果进行“谱-毒”相关分析,发现大极性成分是吴茱萸的肝毒物质基础之一,可作为肝毒性质量控制的 Q-Marker;从现代研究的角度证明了吴茱萸“汤洗”的传统用法可降低吴茱萸的肝毒性。

本研究从历代方剂文献的用法信息挖掘入手,通过对吴茱萸“方剂构成-功效主治-传统用法”的分析,选择古人旨在“减毒”的“久煎”“汤洗”的传统用法为研究切入点,提出基于中药传统用法的中药毒性 Q-Marker 的辨识思路,运用指纹图谱、液质联用、毒理学技术和“谱-毒”相关分析方法,锁定其肝毒物质基础,一方面对吴茱萸的传统用法进行了科学解析,有利于保证临床安全可控用药;另一方面,该肝毒物质基础可作为吴茱萸的毒性 Q-Marker,为其安全质控奠定基础;后续将进一步对其进行直接验证,达到基于“效-毒”相关的含量范围和安全限度,在“药材、饮片、提取物、中成药”全产业链中可控的动态“标识”过程。

参考文献

- [1] 孙 蓉, 李晓宇, 王 亮, 等. 基于“效-毒”相关的 Q-marker 合理辨识与科学控制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(8): 1224-1231.
- [2] 黄 欣. 日本有关小柴胡汤引起间质性肺炎的研究近况 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1999, 21(5): 20-24.
- [3] 原思通. 对“中药中毒病例攀升”问题的思考 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 3-6.
- [4] 王伽伯, 李春雨, 朱 云, 等. 基于整合证据链的中草药肝毒性客观辨识与合理用药: 以何首乌为例 [J]. 科学通报, 2016, 61(9): 971-980.
- [5] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [6] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3149-3154.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 蔡雪映, 孟 楠, 杨 冰. 服用吴茱萸过量致中毒 1 例分析 [J]. 北京中医, 2006, 25(3): 171.
- [9] 王 会, 朱兰兰, 黄 伟, 等. 提取方式对吴茱萸“质量-毒性”综合评价模式的影响 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(5): 279-281.
- [10] 尹利顺, 吕莉莉, 龚彦胜, 等. 吴茱萸挥发油对大鼠长期毒性实验研究 [J]. 中国药物警戒, 2015, 12(1): 20-25.
- [11] 黄 伟, 孙 蓉. 吴茱萸水提组分对大鼠长期毒性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 269-273.
- [12] Yang X W, Zhang H, Li M, *et al.* Studies on the alkaloid constituents of *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth var. *bodinaieri* (Dode) Huang and their acute toxicity in mice [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(8): 697-703.
- [13] 黄 伟, 李晓骄阳, 孙 蓉. 吴茱萸水提组分多次给药对小鼠肝毒性的“量-时-毒”关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2223-2227.
- [14] 黄 伟, 孙 蓉. 吴茱萸水提组分多次给药致小鼠肝毒性氧化损伤机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 114-116.
- [15] 周 璐, 姚广涛, 曹智丽, 等. 吴茱萸水煎液致小鼠肝毒性机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 269-272.
- [16] 秦 猛, 周长征, 吕培轩, 等. 吴茱萸饮片炮制研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2007, 26(9): 550-552.
- [17] 谭小燕, 罗乔奇, 马郑红, 等. 不同产地麦冬 ¹H-NMR 模式识别研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 792-797.
- [18] 张海军. 咖啡酰缩酚酸类化合物的研究近况 [J]. 国外医学: 药学分册, 1993, 20(2): 77-80.
- [19] 孙 蓉, 黄 伟. 吴茱萸水提组分镇痛及伴随毒副作用研究 [J]. 中国药物警戒, 2012, 19(11): 641-645.
- [20] 黄 伟, 孙 蓉, 吕丽莉, 等. 吴茱萸水提组分单次给药对小鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 96-99.
- [21] 彭怀仁. 中医方剂大辞典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.